



Ministero delle Attività Produttive
Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2

REC'D 08 APR 2004	
WIPO	PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

N. MO2003 A 000019

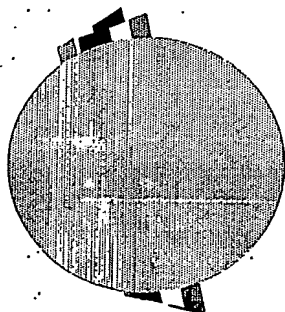


*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li

2 MAR. 2004



IL DIRIGENTE
Paolo Pano

MODULO A

202

20

LORENZ BIOTECH S.P.A.

SP

codice **02125311205**

145

office L U C C I N E R T A

[illegible]

via **Corassori** | n. **54** | città **Modena** | cap. **41100** | (prov.) **MO**

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

Apparato e metodo di elettrostimolazione e relativo supporto di dati

E. INVENTORI DESIGNATI COGNOME NOME COGNOME NOME

2) _____ 4)

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R	Data	N° Protocollo
--------------------------	------------------	-------------------	------------------	-----------------	------	---------------

[illegible]

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione NEOMEDIAN HOLTER

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLIGATA N. es. SCIOGLIMENTO RISERVE
Data _____ N. Protocollo _____

Doc. 1) **1** **PROV** n. pag. **32** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

11/07/2007

Dis. 000114 1-11

[illegible]

Page 1 of 1

Doc. 9)			documenti di priorità con traduzione in italiano	confronta singole priorità
Doc. 10)				

Doc. n° **MS**

autorizzazione o atto di cessione

_____ / _____ / _____

Doc. 7)  nominativo completo del richiedente

28 01 2003 Dott. Ing. Pietro CECCONIA obbligato

COMPILATO IL 20/05/2009 FIRMA DEL(LE) RICHIEDENTE (I) Dot. Ing. Pietro CRONOLA
NO

CONTINUA SI/NO ☒ 11.0000 Dargos

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO ☒ SI

CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA | MODENA

ARTIGIANATO AGRICOLTURA DI MODENA codice 3
MO2003A000019

Vendace di deposito

L'anno millenovecento _____, il giorno _____, del mese di _____

Il/le richiedente/i sopraindicato/i ha/hanno presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 001 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

1. ANNOTAZIONI VARIE DELL' UFFICIALE ROGANTE

II DEPOSITANTE

12

[Handwritten signature]

NUMERO DOMANDA

M02003A000019

NUMERO BREVETTO

DATA DI

28/01/2003

DATA DI RILASCIO

/ /

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

LORENZ BIOTECH S.P.A.

Residenza

Medolla (MO)

D. TITOLO

Apparato e metodo di elettrostimolazione e relativo supporto di dati

Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo) /

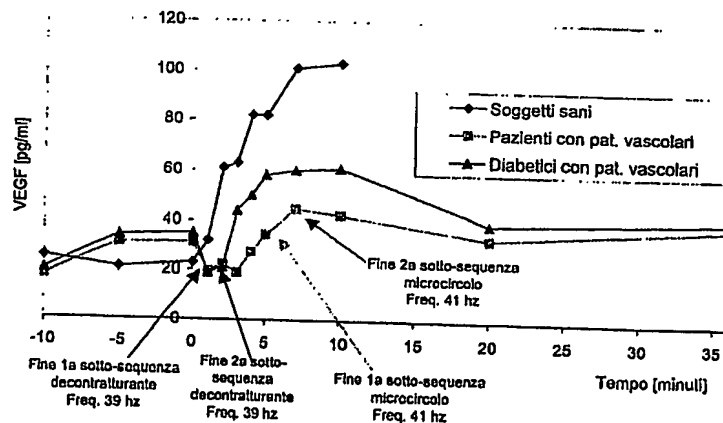
L. RIASSUNTO

Un apparato di elettrostimolazione comprende mezzi generatori di impulsi elettrici disposti per generare impulsi aventi valori prefissati di parametri tipici, mezzi applicatori disposti per applicare una sequenza di detti impulsi ad un organismo, e mezzi di variazione disposti per effettuare una variazione sostanziale di almeno uno di detti parametri durante detta sequenza.

Un metodo di elettrostimolazione di un organismo comprende generare una sequenza di impulsi elettrici aventi valori prefissati di parametri tipici, applicare detti impulsi a detto organismo, detto generare comprendendo variare in maniera sostanziale almeno uno di detti parametri durante detta sequenza.

Un supporto leggibile da mezzi elaboratori di dati reca una pluralità di dati aventi valori prefissati di parametri tipici, detti dati essendo destinati a dare origine ad una sequenza di impulsi elettrici da applicare ad un organismo mediante tecniche di elettrostimolazione, in detta sequenza essendo prevista una variazione sostanziale di almeno uno di detti parametri.

M. DISEGNO



Pietro Longo

MO2003A000019

LORENZ BIOTECH S.P.A.

Descrizione di invenzione industriale

Depositata il 28 GEN. 2003

Apparato e metodo di elettrostimolazione e relativo
supporto di dati

L'invenzione concerne un apparato e un metodo di elettrostimolazione, ed un supporto leggibile tramite mezzi elaboratori di dati sul quale sono registrati dati necessari per il funzionamento dell'apparato e l'attuazione del metodo.

L'apparato ed il metodo di elettrostimolazione secondo l'invenzione sono particolarmente adatti ad effettuare una neurostimolazione bioattiva per la modulazione delle citochine e del metabolismo cellulare enzimatico.

Dati clinici dimostrano che più della metà della popolazione dei paesi occidentali soffre di patologie riguardanti l'ambito vascolare, ed in particolare il sistema cardio-vascolare. Nelle pareti vascolari si manifestano frequentemente alterazioni causate da patologie degenerative quali l'arteriosclerosi che, assieme alla trombosi, costituisce una delle più frequenti cause di ostruzione delle arterie periferiche e di quelle che interessano il miocardio ed il cervello.



L'arteriosclerosi si manifesta in maniera particolarmente aggressiva e prematura nei pazienti diabetici, che costituiscono circa il 3% della popolazione in Europa ed analoghe percentuali della popolazione in Italia. Tale patologia è accompagnata da complicazioni a lungo termine altamente invalidanti per il paziente, dovute alla degenerazione dei vasi maggiori (macro-angiopatia), dei piccoli vasi (micro-angiopatia) e del sistema nervoso periferico e vegetativo (neuropatia). La macro-angiopatia periferica nei pazienti diabetici produce sintomi analoghi a quelli osservati nei pazienti non diabetici; tuttavia, essa si manifesta prematuramente e con una frequenza maggiore, e peggiora assai rapidamente.

Per i motivi sopra esposti, nei pazienti diabetici le patologie vascolari determinano una mortalità doppia rispetto ai pazienti non diabetici e rendono necessari lunghi ricoveri ospedalieri, con pesanti conseguenze economiche e sociali.

Inoltre, nei pazienti diabetici l'arteriosclerosi è responsabile della maggior parte delle amputazioni degli arti inferiori (50-70%), che si manifestano in tali pazienti con una frequenza 5 volte superiore rispetto ai pazienti non diabetici. L'occlusione



delle arterie distali di piccolo e medio calibro al di sotto del ginocchio è responsabile dello sviluppo della cancrena. Inoltre i pazienti diabetici sono affetti più frequentemente di quelli non diabetici da claudicatio intermittens dovuta all'ischemia dei muscoli del polpaccio, della coscia o del gluteo.

Sono state recentemente scoperte e descritte in letteratura alcune sostanze prodotte dalle cellule endoteliali che provocano la formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi) e la vasodilatazione, come ad esempio il fattore di crescita fibroblastico (Fibroblast Growth Factor - FGF), il fattore di crescita neuronale (Neuronal Growth Factor - NGF), il fattore di crescita vasco-endoteliale (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF).

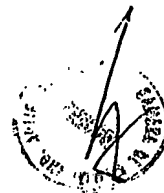
Per favorire l'angiogenesi, è possibile iniettare VEGF e altri fattori angiogenici quali FGF direttamente nel letto vascolare interessato da ischemia e/o occlusione. Ma l'iniezione diretta di VEGF o altri fattori angiogenici comporta numerosi inconvenienti, dovuti principalmente alle difficoltà di rilascio a tutte le cellule interessate. Infatti, meno del 2% del VEGF iniettato partecipa effettivamente alla neo-angiogenesi; inoltre, il metodo è potenzialmente tossico.



Esperimenti condotti da Kanno et al. hanno dimostrato che applicando una stimolazione elettrica continua per 5 giorni su muscoli animali isolati, tramite impulsi aventi un'ampiezza di 0.3 ms, una frequenza di 50 hz ed un'intensità di 0.1 V, si osserva un incremento della produzione di VEGF e si favorisce la neo-angiogenesi, attraverso un aumento del numero di capillari e del flusso sanguigno.

Sebbene tali esperimenti sembrano suggerire che la stimolazione elettrica dei muscoli ha effetti benefici sulla circolazione, essi non insegnano come applicare una stimolazione elettrica ad esseri umani. Inoltre, essi richiedono un tempo di trattamento pari a diversi giorni, che potrebbe causare disagi al paziente a causa della sua lunghezza eccessiva.

E' inoltre noto impiegare la rivascolarizzazione transmiocardica tramite laser per ridurre il dolore causato dall'angina; questo determina un aumento del livello di VEGF nel miocardio e nelle cellule endoteliali di capillari e arteriole (Lee, SH, WolfPL, Escudero R, N Eng. J. Med. 2000; 342, 626-33). Tuttavia, la rivascolarizzazione transmiocardica tramite laser è una tecnica invasiva che conduce a risultati limitati.



US 2002/0010492 descrive un dispositivo di elettrostimolazione per la produzione controllata di fattori di crescita angiogenici, tramite il quale è possibile, in vitro, incrementare del 30-40% il livello di VEGF con un'elettrostimolazione continua della durata di almeno 8 ore.

Anche in questo caso, tuttavia, sono richiesti lunghi tempi di trattamento che provocano non trascurabili disagi al paziente.

WO 02/09809 descrive un apparato per il trattamento di patologie vascolari, o muscolari, o dei tendini, tramite il quale ad un paziente viene applicata una serie di impulsi elettrici aventi un'ampiezza da 10 a 40 μ s ed un'intensità da 100 a 170 μ A. In questo modo è possibile ottenere un aumento nella produzione di VEGF, con conseguente vasodilatazione e neoangiogenesi.

Uno scopo dell'invenzione è migliorare le condizioni dei pazienti affetti da patologie vascolari, e più in particolare dei pazienti diabetici che soffrono di tali patologie.

Un ulteriore scopo dell'invenzione è stimolare la produzione di elevate quantità di sostanze che favoriscano la formazione di nuovi vasi sanguigni e la dilatazione di quelli esistenti, in particolare

R



VEGF, con tempi di trattamento relativamente brevi, ossia senza sottoporre il paziente ad estenuanti trattamenti della durata di parecchie ore.

In particolare, si desidera indurre nell'organismo una produzione di VEGF o di altri fattori di crescita in quantità sostanzialmente superiori a quelle ottenute tramite l'apparato descritto in WO 02/09809.

Secondo un primo aspetto dell'invenzione, è previsto un apparato di elettrostimolazione, comprendente mezzi generatori di impulsi elettrici disposti per generare impulsi aventi valori prefissati di parametri tipici, mezzi applicatori disposti per applicare una sequenza di detti impulsi ad un organismo, caratterizzato dal fatto che, comprende inoltre mezzi di variazione disposti per effettuare una variazione sostanziale di almeno uno di detti parametri durante detta sequenza.

In un secondo aspetto dell'invenzione, è previsto un metodo di elettrostimolazione di un organismo, comprendente generare una sequenza di impulsi elettrici aventi valori prefissati di parametri tipici, applicare detti impulsi a detto organismo, caratterizzato dal fatto che, detto generare comprende variare in maniera sostanziale almeno uno di detti parametri durante detta sequenza.

In un terzo aspetto dell'invenzione, è previsto un supporto leggibile da mezzi elaboratori di dati, recante una pluralità di dati aventi valori prefissati di parametri tipici, detti dati essendo destinati a dare origine ad una sequenza di impulsi elettrici da applicare ad un organismo mediante tecniche di elettrostimolazione, caratterizzato dal fatto che, in detta sequenza è prevista una variazione sostanziale di almeno uno di detti parametri.

Preferibilmente, detto il parametro che viene variato in maniera sostanziale è la frequenza degli impulsi.

Ancora preferibilmente, la variazione di detto parametro comporta una diminuzione del rispettivo valore.

Tale diminuzione è vantaggiosamente di un ordine di grandezza.

Come verrà di seguito descritto in dettaglio, i risultati sperimentali hanno dimostrato che grazie all'invenzione, e particolarmente grazie alla variazione sostanziale che si verifica in uno dei parametri tipici nella sequenza di impulsi elettrici, è possibile ottenere un effetto decontratturante sulle fibre muscolari, un effetto vaso-attivo sui vasi e sui neuro-recettori ed un rilascio di fattori



di crescita. E' inoltre possibile ottenere un effetto antinfiammatorio ed un'inibizione delle citochine responsabili dell'infiammazione. Infine, l'invenzione permette di ottenere una stimolazione delle piccole fibre afferenti neurologiche e una migliore interazione con il sistema motorio.

Poiché gli effetti positivi riscontrati sono legati alla sostanziale variazione di un parametro tipico, che avviene in maniera quasi istantanea, non è più necessario sottoporre il paziente ad un trattamento avente una durata di parecchie ore, in quanto già una seduta di pochi minuti permette di osservare i suddetti miglioramenti.

Inoltre, gli impulsi elettrici sono preferibilmente applicati per via transcutanea, ossia utilizzando una tecnica pressoché non invasiva che non arreca particolari disagi al paziente.

L'invenzione sarà meglio compresa ed attuata con riferimento alle allegate figure, che ne mostrano alcuni esempi non limitativi di attuazione, in cui:

Figura 1 è una tabella evidenziante le sottofasi di una sequenza di stimolazione ad effetto decontratturante;



R.

Figura 2 è una tabella evidenziante le sottofasi di una sequenza di stimolazione ad effetto antinfiammatorio;

Figura 3 è una tabella evidenziante le sottofasi di una sequenza di stimolazione ad effetto attivazione del microcircolo;

Figura 4 mostra l'andamento dei parametri operativi durante la sequenza di attivazione del microcircolo rappresentata in Figura 3;

Figura 5 è una tabella evidenziante i livelli di VEGF riscontrati in pazienti sottoposti ad un trattamento di elettrostimolazione secondo l'invenzione;

Figura 6 evidenzia i livelli di VEGF rilevati durante la stimolazione sperimentale di una zona distale della gamba;

Figura 7 mostra un dettaglio di Figura 6;

Figura 8 è una tabella evidenziante le sottofasi appartenenti alla prima parte di una sequenza di stimolazione neuro-muscolare del muscolo ipotonico;

Figura 9 è una tabella evidenziante le sottofasi appartenenti alla seconda parte della sequenza di Figura 8.

Un apparato per l'elettrostimolazione comprende uno o più generatori di impulsi elettrici, controllati preferibilmente tramite un dispositivo di controllo



provvisto di un microprocessore, atto a modulare secondo prefissate sequenze la frequenza, e/o l'ampiezza e/o l'intensità degli impulsi elettrici. Questi ultimi sono preferibilmente sottosoglia, ossia vengono mantenuti a valori di intensità tali da non causare contrazione del muscolo o sensazione di dolore nel paziente.

L'apparato comprende inoltre mezzi di applicazione degli impulsi elettrici ad un organismo, quale un essere umano o un animale da laboratorio, comprendenti preferibilmente elettrodi dotati di una superficie a elevata conduttività che vengono posizionati direttamente sulla pelle del paziente per trasmettere gli impulsi in maniera transcutanea.

I parametri che contraddistinguono gli impulsi sono definiti sulla base della reobase e/o della cronassia del tessuto muscolare stimolato, o in generale sulla base della bioreazione. Per reobase si intende l'intensità di corrente minima necessaria per eccitare un tessuto, mentre la cronassia è la durata minima che un impulso elettrico di intensità doppia della reobase deve avere per generare stimolazione.

La bioreazione è definita come il tempo che intercorre fra un fronte di discesa di un impulso applicato ed il fronte di salita dell'impulso



successivo, ossia il tempo di reazione biologica a disposizione di un determinato tessuto prima dell'applicazione dell'impulso successivo.

Sono inoltre presenti mezzi di variazione disposti per variare i parametri tipici degli impulsi applicati, ed in particolare la frequenza e la lunghezza d'onda, oppure l'ampiezza.

Gli impulsi generati dall'apparato secondo l'invenzione hanno preferibilmente un'ampiezza da 1 a 90 μ s, una frequenza da 0.1 hz a 1khz, ed un'intensità di corrente da 10 a 200 μ A. La loro tensione di picco è al di sopra di 50 V e può variare fino a 300 V.

Più preferibilmente, i suddetti impulsi hanno un'ampiezza compresa fra 1 e 49 μ s, una frequenza da 0.1 hz a 100 hz, un'intensità di corrente da 10 a 100 μ A ed una tensione di picco fino a 200 V.

Ancora più preferibilmente, l'ampiezza degli impulsi varia da 1 a 40 μ s, la frequenza da 0.1 hz a 100 hz e la tensione di picco arriva fino a 300 V.

L'apparato di elettrostimolazione è configurato in maniera tale da applicare una sequenza di stimoli comprendenti una successione prefissata di apposite sottosequenze. Ciascuna sottosequenza è il risultato della modulazione di frequenza, ampiezza e intensità



secondo un protocollo che dipende dall'effetto biochimico desiderato sulle cellule e sui tessuti.

Per esempio, per ottenere un effetto decontratturante sulle fibre muscolari è consigliabile applicare una sequenza di impulsi sottosoglia che stimolano il muscolo con una frequenza gradualmente in aumento, fino ad arrivare ad una condizione di tetania in cui il muscolo raggiunge una situazione di spasmo. Successivamente, la frequenza viene bruscamente ridotta al valore di 1 hz, così da creare un evento traumatico e indurre il rilassamento muscolare.

Un esempio di tale sequenza è mostrato in Figura 1, e comprende 27 sottofasi secondo i parametri indicati. Nella prima sottofase, al paziente vengono inviati, per un periodo di 20 secondi, treni di impulsi ad una frequenza di un impulso al secondo (1 hz), con una durata di ciascun impulso, ossia un'ampiezza, pari a 10 microsecondi. Durante la seconda sottofase, avente una durata di 5 secondi, al paziente vengono applicati treni di impulsi aventi una frequenza di 1 hz ed una durata di ciascun impulso pari a 20 microsecondi. Si procede aumentando gradualmente la frequenza degli impulsi di ogni sottofase, fino ad arrivare alla sottofase 13, in cui la frequenza raggiunge un valore di 29 hz con una durata



dell'impulso di 40 microsecondi. La sottofase successiva prevede una repentina diminuzione della frequenza degli impulsi, che cala di un ordine di grandezza passando da 29 hz a 1 hz, e della loro durata, che scende da 40 microsecondi a 10 microsecondi, dopodiché la frequenza, e con essa la durata dell'impulso, vengono nuovamente aumentate in maniera graduale, fino a raggiungere un valore finale rispettivamente di 39 hz e di 40 microsecondi.

Gli esperimenti effettuati hanno mostrato che è particolarmente importante, ai fini di ottenere la decontrazione del muscolo, applicare a quest'ultimo un'improvvisa diminuzione della frequenza. Per rafforzare gli effetti positivi della diminuzione di frequenza, è possibile ripetere più volte di seguito la sequenza della Figura 1, nel qual caso la repentina discontinuità nell'andamento della frequenza si verifica un maggior numero di volte.

Per ottenere invece un'azione efficace sui vasi sanguigni ed un effetto antinfiammatorio, è necessario che vengano rilasciate sostanze quali i fattori di crescita, che favoriscono la neo-angiogenesi e producono citochine in grado di provocare un effetto antinfiammatorio. Al tempo stesso, occorre inibire la formazione di altre

citochine che sono responsabili dello stato infiammatorio, quali ad esempio $\text{TNF-}\alpha$, interleuchina-6, interferone- α e cortisolo.

Per fare ciò senza stimolare il tessuto per un tempo eccessivamente lungo e con un rilascio marginale di energia, vengono applicate al paziente sequenze di impulsi in cui la frequenza viene rapidamente aumentata fino a raggiungere il valore desiderato. Tale valore è diverso a seconda della sostanza della quale si vuole ottenere il rilascio, la produzione o l'inibizione.

L'inventore ha ipotizzato che il campo elettrico applicato dall'apparato di elettrostimolazione crei una serie di vibrazioni mediante la polarizzazione e la depolarizzazione ad impulsi delle cellule e delle molecole. Tali vibrazioni inducono condizioni di risonanza all'interno di sottostrutture delle cellule del tessuto connettivo, e più in particolare delle cellule endoteliali, dei muscoli, del derma e dell'epidermide, quali ad esempio la membrana cellulare, i mitocondri e/o le molecole o i complessi immunologici. Questo provoca il rilascio negli spazi interstiziali e quindi nel sangue in circolo di specifici enzimi, citochine e fattori di crescita.

A seconda del diverso modello di risonanza indotto nelle sottostrutture cellulari, molecole differenti vengono trascritte o rilasciate. Pertanto, variando opportunamente la frequenza degli impulsi applicati, è possibile raggiungere la frequenza propria di risonanza corrispondente al tipo di molecole che si desidera rilasciare o inibire.

Un esempio di sequenza di impulsi da applicare qualora si desideri ottenere un effetto antinfiammatorio, operante secondo il meccanismo sopra delineato, è riportato in Figura 2.

Per ottenere un'attivazione del microcircolo, è invece possibile applicare una sequenza del tipo mostrato in Figura 3. Le variazioni dei parametri tipici dell'impulso per quest'ultima sequenza sono rappresentate in Figura 4.

Come si può notare, dopo una sottosequenza iniziale sostanzialmente analoga alla parte iniziale della sequenza di Figura 1 e volta ad ottenere un effetto decontratturante, nella sottofase 13 la frequenza viene bruscamente diminuita fino al valore di 1 hz e successivamente aumentata fino a 11 hz, dopodiché viene mantenuta costante per alcuni secondi, così da causare un'azione efficace sui vasi sanguigni. A questo punto, ossia a partire dalla sottofase 38, il

valore della frequenza viene aumentato di 10 hz ad ogni sottofase, fino a raggiungere il valore di 41 hz, in prossimità del quale è stato sperimentalmente verificato che si ottiene il massimo rilascio di VEGF. Tale frequenza sembra ragionevolmente essere la frequenza di risonanza del VEGF.

Per ottenere un livello ancora più elevato di VEGF nel sangue, è possibile ripetere la suddetta sequenza più volte durante il giorno.

Ripetendo successivamente una medesima sequenza più volte di seguito è stato sorprendentemente osservato un effetto sinergico, in quanto si è visto che il risultato ottenuto è superiore alla somma dei risultati che sarebbe stato logico aspettarsi applicando due sequenze l'una indipendentemente dall'altra.

Questo sembra essere dovuto alla diminuzione repentina della frequenza degli impulsi applicati, ossia al brusco passaggio da un valore di frequenza relativamente elevato al valore iniziale di 1 hz, il che introduce una soluzione di continuità negli impulsi applicati che si traduce in una notevole variazione di energia. Ripetendo più volte la sottosequenza, si verifica un effetto analogo al cosiddetto "colpo d'ariete" che si manifesta in campo



PC



idraulico, tramite il quale la stimolazione mediante impulsi elettrici sottosoglia permette la rottura di legami chimici deboli e il rilascio di elevate quantità delle molecole desiderate o la loro trasformazione, senza indurre un significativo trasferimento di energia al tessuto.

La variazione di frequenza applicata è preferibilmente superiore a 20 hz, più preferibilmente superiore a 40 hz e, in alcuni casi particolari, può essere vantaggiosamente maggiore di 60 hz.

L'ipotesi sopra formulata è stata verificata sperimentalmente stimolando come sopra descritto un arto inferiore di 10 pazienti diabetici, di 10 pazienti non diabetici e di 10 soggetti sani il cui comportamento è stato osservato a scopo di controllo. Più in particolare, gli impulsi sono stati applicati alla parte distale periferica della gamba.

La sequenza di stimolazione applicata a tutti gli individui partecipanti all'esperimento comprendeva due sotto-sequenze consecutive volte ad ottenere la decontrazione muscolare, seguite da due sotto-sequenze di attivazione del microcircolo, secondo quanto sopra descritto. Successivamente, veniva applicata una stimolazione per un periodo di 10



minuti ad una frequenza costante di 100 hz e con un'ampiezza costante degli impulsi, pari a 40 microsecondi.

Agli individui partecipanti all'esperimento sono stati prelevati campioni di sangue della circolazione sistemica (prelievo dalla vena brachiale) 10 e 5 minuti prima della stimolazione, e 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 20 e 40 minuti dopo l'inizio della stimolazione. I risultati ottenuti sono mostrati nelle Figure 5, 6 e 7.

In particolare, in Figura 5 sono riportati i valori medi di VEGF misurati nei campioni sanguigni delle diverse tipologie di pazienti agli istanti indicati. I valori a -10 e -5 minuti si riferiscono al periodo che precede la stimolazione, i valori a 0, 1 e 2 minuti sono misurati durante le sotto-sequenze di decontrazione muscolare, i valori a 3, 4, 5 e 7 minuti sono rilevati durante le sotto-sequenze di attivazione del microcircolo e i valori a 10, 20 e 40 minuti sono misurati durante la sotto-sequenza finale a frequenza ed ampiezza costante. L'andamento di VEGF rilevato è indicato graficamente nelle Figure 6 e 7. Come si può notare, alla conclusione di ogni sotto-sequenza si verifica un salto nei valori di VEGF misurati. I soggetti sani mostrano aumenti del VEGF

fino a 5 volte rispetto al loro valore di base, mentre nei pazienti diabetici il valore di VEGF aumenta fino a 3 volte rispetto al valore iniziale.

Si nota inoltre che, se l'elettrostimolazione non viene applicata in maniera appropriata, il VEGF non aumenta. Questo è dimostrato dall'ultima fase, in cui la frequenza e l'ampiezza degli impulsi vengono mantenute costanti e, sia nei pazienti diabetici che in quelli non diabetici, il VEGF tende a diminuire ritornando ai valori di base entro 10 minuti.

Soltanto quando la frequenza di stimolazione viene opportunamente modificata, in maniera tale raggiungere la frequenza propria delle cellule che producono VEGF e quindi diminuire repentinamente la frequenza per creare un evento traumatico, si rileva un effettivo e consistente aumento di tale fattore di crescita, per un meccanismo sotto certi aspetti analogo a quello che governa il cosiddetto "colpo d'ariete".

Gli aumenti di VEGF riscontrati, come mostrati nelle Figure 5, 6 e 7, appaiono particolarmente significativi se si considera che essi sono stati misurati nei campioni di sangue prelevati dalla vena brachiale dei soggetti studiati, mentre l'elettrostimolazione è stata effettuata nella parte

distale periferica della gamba. Ciò significa che il VEGF, dopo essere stato prodotto nella zona stimolata, si è diffuso rapidamente in tutto l'organismo determinando un aumento consistente del valore medio di VEGF presente nel sangue del paziente a livello sistemico.

Pertanto, l'aumento di VEGF dal valore di 21 pg/ml rilevato dopo 2 minuti di elettrostimolazione al valore di 60 pg/ml misurato dopo 7 minuti di elettrostimolazione nel sangue prelevato dalla vena brachiale dei pazienti diabetici è indicativo di un aumento di VEGF ben più consistente nella zona stimolata, interessata dall'occlusione dei vasi sanguigni. Questo si traduce, in tale zona, in un sostanziale beneficio al paziente derivante dalla formazione di nuovi vasi sanguigni e dalla dilatazione di quelli esistenti.

E' stato infine ipotizzato di utilizzare una sequenza come quella rappresentata nelle Figure 8 e 9 per la stimolazione delle piccole fibre afferenti neurologiche e la loro interazione con le unità motorie. I dati rappresentati nelle Figure 8 e 9 costituiscono in realtà un'unica sequenza che è stata riportata su due fogli distinti per comodità di rappresentazione. Come si può notare, quest'ultima



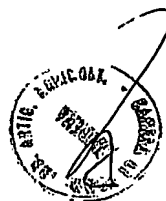
Handwritten signature or initials.

sequenza è una combinazione di una sottosequenza di decontrazione muscolare modificata, seguita da una sottosequenza vasoattiva, dopodiché viene applicata una sottosequenza di attivazione delle piccole fibre nervose fino a raggiungere una frequenza di impulso pari a 220 hz. Questo produce un graduale aumento della prio-ricezione e della sensibilità periferica nei pazienti affetti da paraplegia, tetraplegia o emiplegia, lesioni secondarie al cervello, traumi alla testa o della spina dorsale, colpo apoplettico.

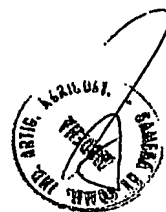


RIVENDICAZIONI

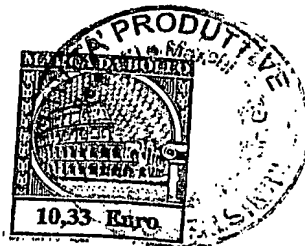
1. Apparato di elettrostimolazione, comprendente mezzi generatori di impulsi elettrici disposti per generare impulsi aventi valori prefissati di parametri tipici, mezzi applicatori disposti per applicare una sequenza di detti impulsi ad un organismo, caratterizzato dal fatto che, comprende inoltre mezzi di variazione disposti per effettuare una variazione sostanziale di almeno uno di detti parametri durante detta sequenza.
2. Apparato secondo la rivendicazione 1, in cui detti mezzi di variazione comprendono mezzi disposti per variare la frequenza di detti impulsi.
3. Apparato secondo la rivendicazione 2, in cui detti mezzi di variazione provocano un salto di frequenza di almeno 20 hz.
4. Apparato secondo la rivendicazione 2, oppure 3, in cui detti mezzi di variazione provocano un salto di frequenza maggiore di 40 hz.
5. Apparato secondo una delle rivendicazioni da 2 a 4, in cui detti mezzi di variazione provocano un salto di frequenza maggiore di 60 hz.



6. Apparato secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui detta variazione implica una diminuzione della frequenza di detti impulsi.
7. Apparato secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui detti mezzi di variazione sono configurati in maniera tale da attuare detta variazione quando viene raggiunta una condizione di spasmo di un muscolo stimolato in detto organismo.
8. Apparato secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui detti mezzi di variazione sono configurati in maniera tale da attuare detta variazione quando viene raggiunta una frequenza a cui avviene un elevato rilascio di fattori di crescita, in particolare di VEGF.
9. Apparato secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui detti mezzi generatori sono disposti per generare all'interno di detta sequenza una successione di impulsi aventi frequenza gradualmente crescente.
10. Apparato secondo la rivendicazione 9, in cui detta successione di impulsi comprende primi impulsi a frequenza gradualmente crescente secondo un primo incremento, e secondi impulsi a frequenza gradualmente crescente secondo un



- secondo incremento, detto secondo incremento essendo maggiore di detto primo incremento.
11. Apparato secondo la rivendicazione 10, in cui detto secondo incremento è maggiore di un ordine di grandezza rispetto a detto primo incremento.
 12. Apparato secondo la rivendicazione 10, oppure 11, in cui detta sequenza comprende, fra detti primi impulsi e detti secondi impulsi, una serie intermedia di impulsi a frequenza sostanzialmente costante.
 13. Apparato secondo la rivendicazione 12, in cui detta serie intermedia comprende impulsi aventi valori dell'intensità di corrente oscillanti fra un valore massimo e un valore minimo.
 14. Apparato secondo la rivendicazione 13, in cui detto valore massimo è sostanzialmente pari al doppio di detto valore minimo.
 15. Apparato secondo una delle rivendicazioni da 9 a 14, in cui detta successione di impulsi precede detta variazione.
 16. Apparato secondo una delle rivendicazioni da 9 a 15, in cui detta successione di impulsi segue detta variazione.
 17. Apparato secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui dopo detta variazione detta



frequenza rimane costante per un certo numero di sottofasi.

18. Apparato secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui detti mezzi generatori sono disposti per generare in successione due o più sequenze fra loro uguali o diverse, cosicché detta variazione venga ripetuta più volte.
19. Apparato secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui detta sequenza è definita da parametri scelti in un gruppo comprendente: la sequenza di Figura 1, la sequenza di Figura 2, la sequenza di Figura 3, la sequenza delle Figure 8 e 9.
20. Metodo di elettrostimolazione di un organismo, comprendente generare una sequenza di impulsi elettrici aventi valori prefissati di parametri tipici, applicare detti impulsi a detto organismo, caratterizzato dal fatto che, detto generare comprende variare in maniera sostanziale almeno uno di detti parametri durante detta sequenza.
21. Metodo secondo la rivendicazione 20, in cui detto variare comprende modificare la frequenza di detti impulsi.



22. Metodo secondo la rivendicazione 21, in cui detto modificare provoca un salto di frequenza di almeno 20 hz.
23. Metodo secondo la rivendicazione 21, oppure 22, in cui detto modificare provoca un salto di frequenza maggiore di 40 hz.
24. Metodo secondo una delle rivendicazioni da 21 a 23, in cui detto modificare provoca un salto di frequenza maggiore di 60 hz.
25. Metodo secondo una delle rivendicazioni da 20 a 24, in cui detto modificare comprende diminuire la frequenza di detti impulsi.
26. Metodo secondo una delle rivendicazioni da 20 a 25, in cui detto variare avviene quando viene raggiunta una condizione di spasmo di un muscolo stimolato in detto organismo.
27. Metodo secondo una delle rivendicazioni da 20 a 26, in cui detto variare avviene quando viene raggiunta una frequenza a cui si verifica un elevato rilascio di fattori di crescita, in particolare di VEGF.
28. Metodo secondo una delle rivendicazioni da 20 a 27, in cui detto generare comprende provvedere all'interno di detta sequenza una successione di impulsi aventi frequenza gradualmente crescente.



29. Metodo secondo la rivendicazione 28, in cui detta successione di impulsi comprende primi impulsi a frequenza gradualmente crescente secondo un primo incremento, e secondi impulsi a frequenza gradualmente crescente secondo un secondo incremento, detto secondo incremento essendo maggiore di detto primo incremento.
30. Metodo secondo la rivendicazione 29, in cui detto secondo incremento è maggiore di un ordine di grandezza rispetto a detto primo incremento.
31. Metodo secondo la rivendicazione 29, oppure 30, in cui detta sequenza comprende, fra detti primi impulsi e detti secondi impulsi, una serie intermedia di impulsi a frequenza sostanzialmente costante.
32. Metodo secondo la rivendicazione 31, in cui detta serie intermedia comprende impulsi aventi valori dell'intensità di corrente oscillanti fra un valore massimo e un valore minimo.
33. Metodo secondo la rivendicazione 32, in cui detto valore massimo è sostanzialmente pari al doppio di detto valore minimo.
34. Metodo secondo una delle rivendicazioni da 28 a 33, in cui detta successione di impulsi precede detta variazione.

35. Metodo secondo una delle rivendicazioni da 28 a 34, in cui detta successione di impulsi segue detta variazione.
36. Metodo secondo una delle rivendicazioni da 20 a 35, in cui dopo detto variare è previsto mantenere detta frequenza costante per un certo numero di sottofasi.
37. Metodo secondo una delle rivendicazioni da 20 a 36, in cui detto generare comprende eseguire in successione due o più sequenze fra loro uguali o diverse, cosicché detto variare venga ripetuto più volte.
38. Metodo secondo una delle rivendicazioni da 20 a 37, in cui detta sequenza è definita da parametri selezionati in un gruppo comprendente: la sequenza di Figura 1, la sequenza di Figura 2, la sequenza di Figura 3, la sequenza delle Figure 8 e 9.
39. Supporto leggibile da mezzi elaboratori di dati, recante una pluralità di dati aventi valori prefissati di parametri tipici, detti dati essendo destinati a dare origine ad una sequenza di impulsi elettrici da applicare ad un organismo mediante tecniche di elettrostimolazione, caratterizzato dal fatto che, in detta sequenza è



- prevista una variazione sostanziale di almeno uno di detti parametri.
40. Supporto secondo la rivendicazione 39, in cui detta variazione corrisponde ad un salto di frequenza di detti impulsi.
 41. Supporto secondo la rivendicazione 40, in cui detto salto di frequenza è di almeno 20 hz.
 42. Supporto secondo la rivendicazione 40, oppure 41, in cui detto salto di frequenza è maggiore di 40 hz.
 43. Supporto secondo una delle rivendicazioni da 40 a 42, in cui detto salto di frequenza è maggiore di 60 hz.
 44. Supporto secondo una delle rivendicazioni da 39 a 43, in cui detta variazione implica una diminuzione della frequenza di detti impulsi.
 45. Supporto secondo una delle rivendicazioni da 39 a 44, in cui detta variazione è prevista in prossimità di valori di detti parametri che provocano una condizione di spasmo di un muscolo stimolato in detto organismo.
 46. Supporto secondo una delle rivendicazioni da 39 a 45, in cui detta variazione è prevista in prossimità di valori di detti parametri in cui



avviene un elevato rilascio di fattori di crescita, in particolare di VEGF.

47. Supporto secondo una delle rivendicazioni da 39 a 46, in cui all'interno di detta sequenza è prevista una successione di impulsi aventi frequenza gradualmente crescente.
48. Supporto secondo la rivendicazione 47, in cui detta successione di impulsi comprende primi impulsi a frequenza gradualmente crescente secondo un primo incremento, e secondi impulsi a frequenza gradualmente crescente secondo un secondo incremento, detto secondo incremento essendo maggiore di detto primo incremento.
49. Supporto secondo la rivendicazione 48, in cui detto secondo incremento è maggiore di un ordine di grandezza rispetto a detto primo incremento.
50. Supporto secondo la rivendicazione 48, oppure 49, in cui detta sequenza comprende, fra detti primi impulsi e detti secondi impulsi, una serie intermedia di impulsi a frequenza sostanzialmente costante.
51. Supporto secondo la rivendicazione 50, in cui detta serie intermedia comprende impulsi aventi valori dell'intensità di corrente oscillanti fra un valore massimo e un valore minimo.

52. Supporto secondo la rivendicazione 51, in cui detto valore massimo è sostanzialmente pari al doppio di detto valore minimo.
53. Supporto secondo una delle rivendicazioni da 44 a 49, in cui detta successione di impulsi precede detta variazione.
54. Supporto secondo una delle rivendicazioni da 47 a 53, in cui detta successione di impulsi segue detta variazione.
55. Supporto secondo una delle rivendicazioni da 39 a 54, in cui dopo detta variazione detta frequenza rimane costante per un certo numero di sottofasi.
56. Supporto secondo una delle rivendicazioni da 39 a 55, recante dati che consentono di generare in successione due o più sequenze fra loro uguali o diverse, cosicché detta variazione venga ripetuta più volte.
57. Supporto secondo una delle rivendicazioni da 39 a 56, in cui detta sequenza è definita da parametri scelti in un gruppo comprendente: la sequenza di Figura 1, la sequenza di Figura 2, la sequenza di Figura 3, la sequenza delle Figure 8 e 9.

Modena, 28/01/2003

Per incarico

LUPPI & CRUGNOLA S.r.l.
Viale Corassori, 54 I - 41100 MODENA
Dott. Ing. Pietro Crugnola

Pietro Crugnola



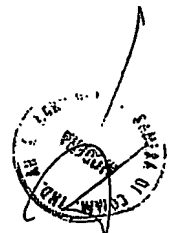
M02003A000019

1/7

LUPPI & CRUGNOLA S.r.l.
 Viale Corassini, 54 I - 41100 MODENA
 Dott. Ing. Pietro Crugnola
Pietro Crugnola

SOTTOFASE	DURATA SOTTOFASE [s]	FREQUENZA [hz]	DURATA IMPULSO [μs]	BIOREAZIONE [μs]
1	20	1	10	999990
2	5	1	20	999980
3	3	1	40	999960
4	1	2	40	499960
5	1	3	40	333293
6	1	4	40	249960
7	1	5	40	199960
8	1	6	40	166627
9	1	7	40	142817
10	1	8	40	124960
11	1	9	40	111071
12	1	19	40	52592
13	1	29	40	34443
14	4	1	10	999990
15	2	1	20	999980
16	2	1	40	999960
17	1	2	40	499960
18	2	3	40	333293
19	1	4	40	249960
20	2	5	40	199960
21	1	6	40	166627
22	2	7	40	142817
23	1	8	40	124960
24	2	9	40	111071
25	1	19	40	52592
26	1	29	40	34443
27	1	39	40	25601

Fig. 1



M02003A00001

2/7

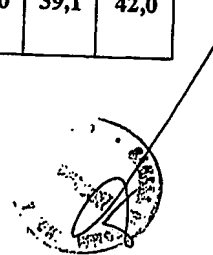
LUPPI & CRUGNOLA S.r.l.
Viale Corassori, 54 I - 41100 MODENA
Dott. Ing. Pietro Crugnola
Pietro Crugnola

SOTTOFASE	DURATA SOTTOFASE [s]	FREQUENZA [hz]	DURATA IMPULSO [μs]	BIOREAZIONE [μs]
1	20	1	10	999990
2	3	1	20	999980
3	3	1	40	999960
4	1	2	40	499960
5	1	3	40	333293
6	1	4	40	249960
7	1	5	40	199960
8	4	6	20	166647
9	4	6	40	166627
10	4	6	20	166647
11	4	6	40	166627
12	4	7	20	142837
13	4	7	40	142817
14	4	7	20	142837
15	4	7	40	142817
16	1	8	40	124960
17	1	9	40	111071
18	1	19	40	52592
19	1	29	40	34443

Fig. 2

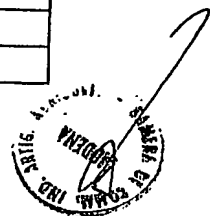
			Sequenze decontratturanti			Sequenze di attivazione microcircolo				Freq. 100 hz - Amp. 40 μs		
Tempo [minuti]	-10	-5	0	1	2	3	4	5	7	10	20	40
Valori di VEGF [pg/ml] in soggetti sani	25,0	21,0	23,0	32,0	61,0	63,0	82,0	82,0	101,0	103,0		
Valori di VEGF [pg/ml] in pazienti affetti da patologie vascolari	17,7	31,0	31,1	19,7	22,3	19,0	27,3	34,3	44,7	42,3	33,2	40,2
Valori di VEGF [pg/ml] in pazienti diabetici affetti da patologie vascolari	20,0	34,0	35,0	19,0	21,0	44,0	50,0	58,2	60,0	61,0	39,1	42,0

Fig. 5



SOTTOFASE	DURATA SOTTOFASE [s]	FREQUENZA [hz]	DURATA IMPULSO [μs]	BIOREAZIONE [μs]
1	20	1	10	999990
2	5	1	20	999980
3	3	1	40	999960
4	1	2	40	499960
5	1	3	40	333293
6	1	4	40	249960
7	1	5	40	199960
8	1	6	40	166627
9	1	7	40	142817
10	1	8	40	124960
11	1	9	40	111071
12	1	19	40	52592
13	8	1	10	999990
14	4	1	20	999980
15	2	1	30	999970
16	1	1	40	999960
17	8	2	40	499960
18	4	3	40	333293
19	2	4	40	249960
20	1	5	40	199960
21	8	6	10	166657
22	4	6	20	166647
23	2	6	30	166637
24	1	6	40	166627
25	8	7	40	142817
26	4	8	40	124960
27	2	9	40	111071
28	1	10	40	99960
29	4	11	20	90889
30	4	11	40	90869
31	4	11	20	90889
32	4	11	40	90869
33	4	11	20	90889
34	4	11	40	90869
35	4	11	20	90889
36	4	11	40	90869
37	4	11	20	90889
38	4	11	40	90869
39	1	21	40	47579
40	1	31	40	32218
41	1	41	40	24350

Fig. 3



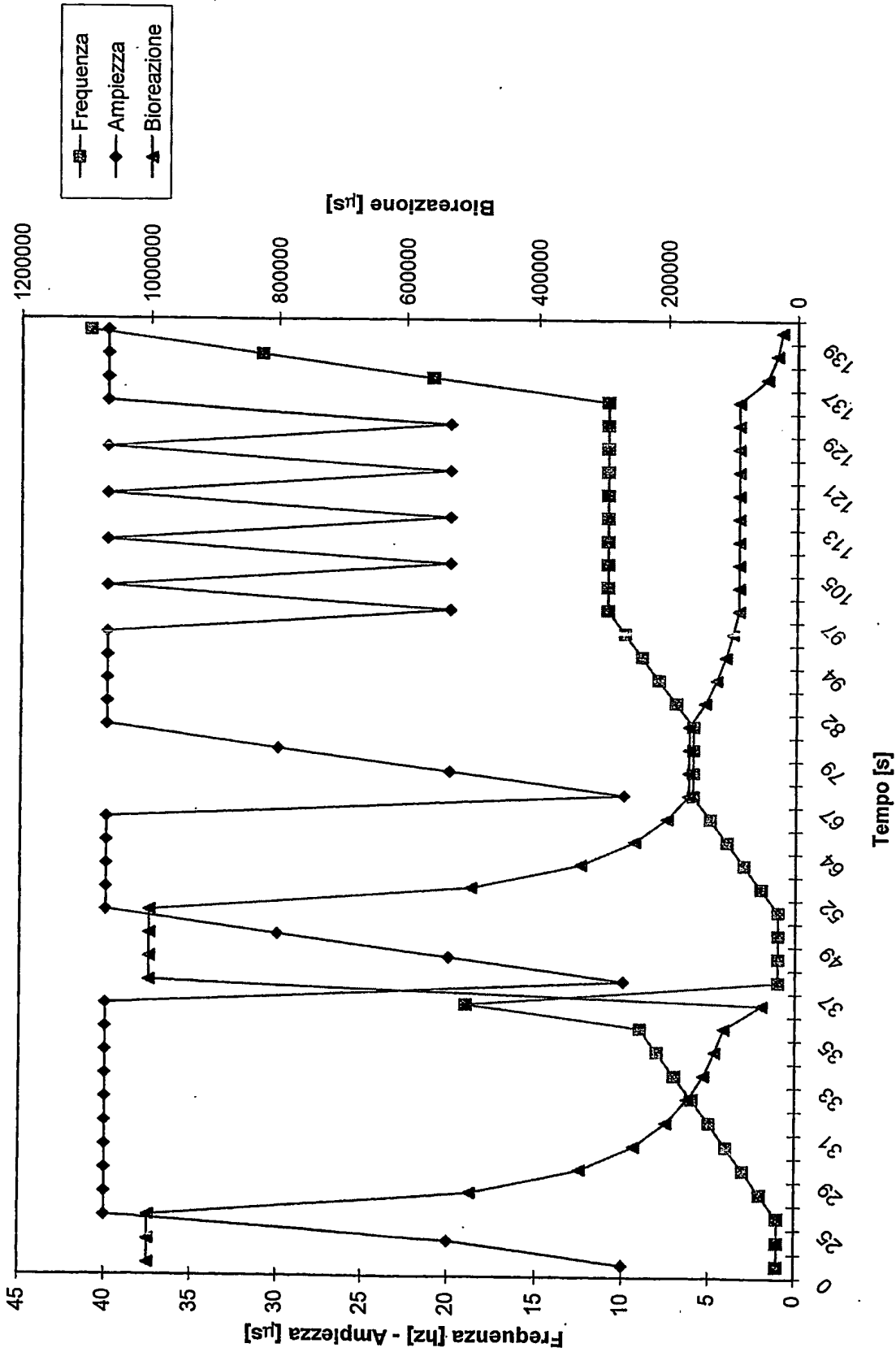
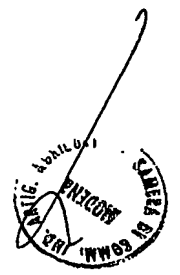


Fig. 4

LUPPI & CRUGNOLA S.r.l.
 Viale Corasori, 54 I - 41100 MODENA
 Dott. Ing. Pietro Crugnola
P. Crugnola



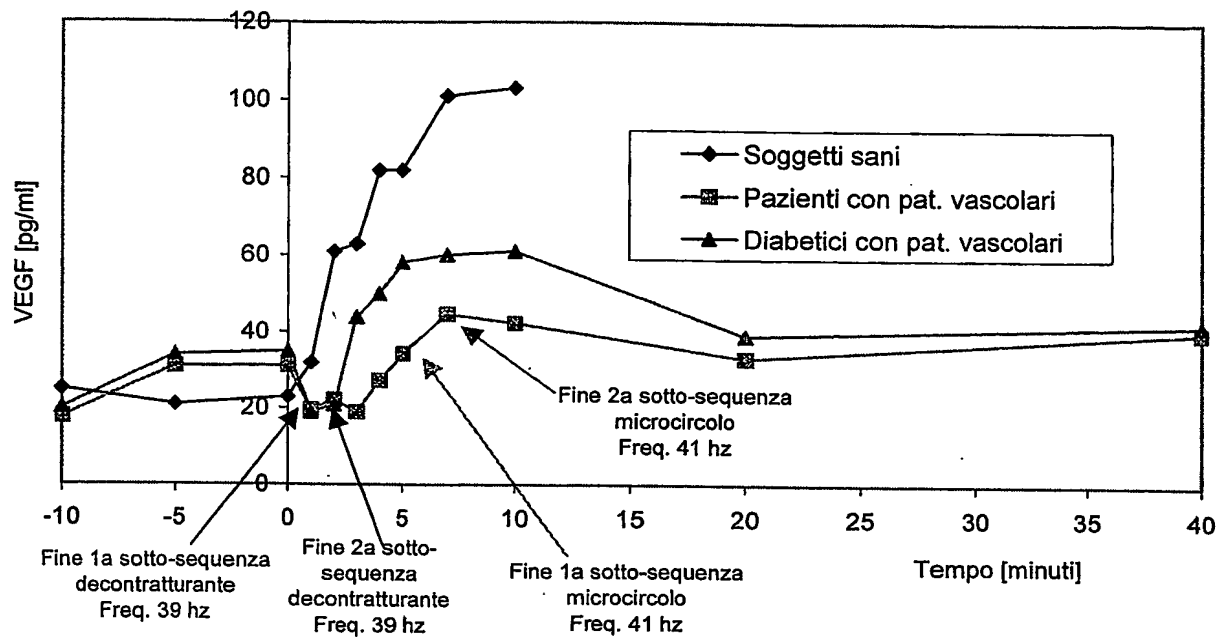


Fig. 6

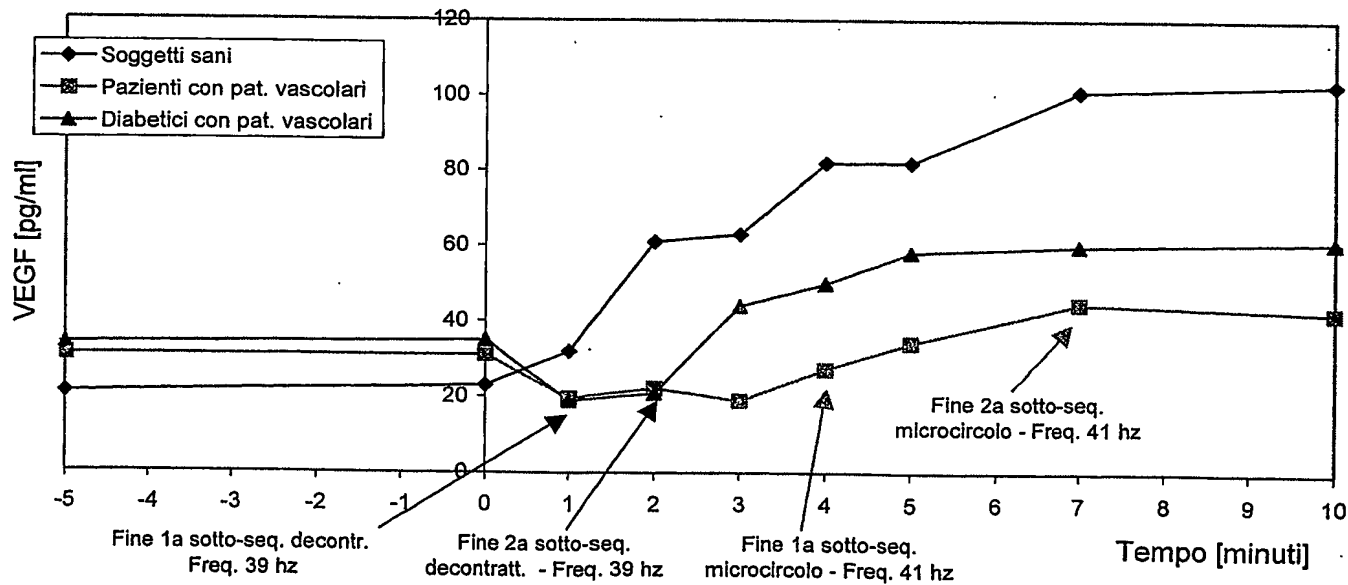
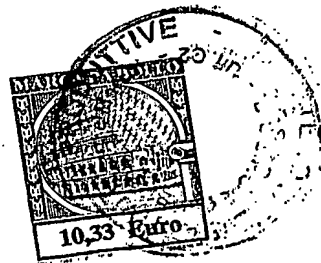


Fig. 7



M02003A00001

6/7

SOTTOFASE	DURATA SOTTOFASE [s]	FREQUENZA [hz]	DURATA IMPULSO [μs]	BIOREAZIONE [μs]
1	30	1	1	999990
2	5	1	2	999980
3	5	1	4	999960
4	1	2	4	499960
5	1	3	4	333293
6	1	4	4	249960
7	1	5	4	199960
8	1	6	4	166627
9	1	7	4	142817
10	1	8	4	124960
11	1	9	4	111071
12	30	11	2	90889
13	4	11	4	90869
14	30	11	2	90889
15	4	15	4	66627
16	2	16	4	62460
17	2	19	4	52592
18	30	1	1	999990
19	5	1	2	999980
20	5	1	4	999960
21	1	2	4	499960
22	1	3	4	333293
23	1	4	4	249960
24	1	5	4	199960
25	1	6	4	166627
26	1	7	4	142817
27	1	8	4	124960
28	1	9	4	111071
29	1	19	4	52592
30	8	1	1	999990
31	4	1	2	999980
32	2	1	3	999970
33	1	1	4	999960
34	8	2	4	499960
35	4	3	4	333293
36	2	4	4	249960
37	1	5	4	199960
38	8	6	1	166657
39	4	6	2	166647
40	2	6	3	166637

Fig. 8

LUPPI & CRUGNOLA S.r.l.
 Viale Corassori, 54 I - 41100 MODENA
 Dott. Ing. Pietro Crugnola
P. Crugnola



M02003A000019

7/7

SOTTOFASE	DURATA SOTTOFASE [s]	FREQUENZA [hz]	DURATA IMPULSO [μs]	BIOREAZIONE [μs]
40	1	6	4	166627
41	8	7	4	142817
42	4	8	4	124960
43	2	9	4	111071
44	1	10	4	99960
45	4	11	2	90889
46	4	11	4	90869
47	4	11	2	90889
48	4	11	4	90869
49	4	11	2	90889
50	4	11	4	90869
51	4	11	2	90889
52	4	11	4	90869
53	4	11	2	90889
54	4	11	4	90869
55	1	21	4	47579
56	1	31	4	32218
57	1	41	4	24350
58	60	2	1	499990
59	30	2	2	499980
60	15	2	4	499960
61	30	4	4	249960
62	1	8	2	124980
63	1	16	1	62490
64	1	8	2	124980
65	1	4	4	249960
66	30	6	4	166627
67	2	12	2	83313
68	2	24	2	41647
69	2	24	2	41647
70	2	24	3	41637
71	2	24	4	41627
72	30	30	4	33293
73	20	40	4	24960
74	60	50	4	19960
75	30	60	4	16627
76	60	90	4	11071
77	60	130	4	7652
78	40	160	4	6210
79	1	200	4	4960
80	120	220	4	4505

Fig. 9

LUPPI & CRUGNOLA S.r.l.
Viale Corassori, 54 I - 41100 MODENA
Dott. Ing. Pietro Crugnola
Pietro Crugnola

